

Title	Dominant negative mutant of ionotropic glutamate receptor subunit GluR3 : implications for the role of a cysteine residue for its channel activity and pharmacological properties
Author(s)	渡瀬, 啓
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40979
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	わたせ 瀬 啓
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 3 4 4 6 号
学位授与年月日	平成 9 年 11 月 4 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Dominant negative mutant of ionotropic glutamate receptor subunit GluR3: implications for the role of a cysteine residue for its channel activity and pharmacological properties (イオンチャネル型グルタミン酸受容体サブユニット GluR3 のドミナントネガティブ変異体: GluR3 のチャネル活性及び薬理学的性質にシステイン残基が果たす役割についての考察)
論文審査委員	(主査) 教授 柳原 武彦 (副査) 教授 祖父江憲治 教授 遠山 正彌

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

AMPA 型グルタミン酸受容体は GluR1, GluR2, GluR3, GluR4 の 4 つのサブユニットからなり、各々にいくつかのスプライズバリエーションが存在する。我々は 1992 年ラットの内耳組織から GluR3 の変異体 sGluR3 を見出した。sGluR3 では GluR3 の細胞外ループの 33 個のアミノ酸 (Y715 から G747) が欠失していた。sGluR3 は正常な AMPA 受容体と複合体を形成して、その機能発現を阻害するドミナントネガティブ変異体であった。ここではその阻害機構を解明し、その作用にとって重要な残基を同定するため、欠失領域に相当する領域に指定部位突然変異誘発法を用いて変異を導入して、その効果を検討した。

[方法及び成績]

GluR3 cDNA から、クンケル法を用いて、各々 Y715~D723, T724~L731, D732~A739, T740~G747 が欠失した 4 種の欠損体 (s1R3, s2R3, s3R3, s4R3) を作製した。cDNA より cRNA を合成し、1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度とした。GluR3 cRNA と変異体 cRNA を 1 : 4 の割合で混合した溶液を用意し、アフリカツメガエル卵に 50 nl ずつ注入した。対照には GluR3 cRNA と水を 1 : 4 で混合した溶液を用いた。3 から 5 日間の培養後、作働薬に対する反応性を 2 電極膜電位固定法により測定した。阻害効果の判定は -70 mV の膜電位固定下で 100 μM のカイニン酸に対する応答を比較する事により行った。その結果、s1R3 (対照比 25.2 \pm 5.1%) 及び s4R3 (同 21.8 \pm 3.7%) に阻害効果を認めた。

そこで s1R3, s4R3 の欠失領域内の各残基の点突然変異体を作製して同様にその効果を調べた。その結果、R3C722A で sGluR3 と同程度の、R3L746A に軽度の阻害効果が認められた。阻害効果は R3C722R にも認めたが、R3L746R や他の残基の点突然変異体では認められなかった。これらの結果から Cys722 が最も阻害作用に重要であると考えられたので、R3C722A を詳細に解析した。

R3C722A cRNA を GluR1 cRNA 或いは GluR1, GluR2, GluR3 cRNA と混注して阻害効果を調べたところ、ホモメリック GluR3 受容体以外のこれら AMPA 受容体に対しても R3C722A は阻害作用を有していた。次に R3C722A 発現が正常サブユニットの翻訳に及ぼす影響を免疫沈降法で調べた。GluR1 cRNA と変異体 cRNA を混注した卵と

GluR1 cRNA のみ注入した卵とで GluR1 の発現量に有意差は認められず、R3C722A は正常サブユニットの翻訳に影響しないと考えられた。

阻害作用のメカニズムとして、R3C722A が正常サブユニットと結合して受容体の細胞内輸送に影響を及ぼす可能性が考えられるので、R3C722A の細胞膜への局在を検討した。cRNA を注入した卵をビオチンの存在下/非存在下で培養し、トリトン X で可溶化した。得られた膜分画をストレプトアビジンと反応させ、抽出した後、SDS-PAGE で解析し、GluR2/3 特異的抗体でイムノブロットを行なった。その結果、R3C722A の細胞膜への局在は、R3 と同程度であり、この変異は受容体の細胞内輸送に影響を及ぼさないものと考えられた。

Cys722 の受容体機能における役割を調べるために R3C722A cRNA を注入した卵を用いて薬理的解析を行った。R3C722A のカイニン酸・グルタミン酸に対する応答は GluR3 より小さかった。R3C722A ではカイニン酸・グルタミン酸に対する容量応答曲線は左方に偏位し、これらに対して GluR3 より高い親和性を示した。AMPA 受容体のアロステリックポテンシエーターであるアニラセタムに対する反応を比較したところ、R3C722A は GluR3 より高い感受性を示した。

[総括]

Cys722 はドミナントネガティブ効果の発現に重要な残基であるとともに、GluR3 の薬理的性質の決定に重要な役割を果たしていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

AMPA 型グルタミン酸受容体は GluR1, GluR2, GluR3, GluR4 の 4 つのサブユニットからなり、それぞれにいくつものスプライズバリエーションが存在する。論文著者は、1992 年ラットの内耳組織から GluR3 の変異体 sGluR3 を見出した。sGluR3 では GluR3 の細胞外ループの 33 個のアミノ酸 (Y715 から G747) が欠失していた。sGluR3 は正常な AMPA 受容体と複合体を形成して、その機能発現を阻害するドミナントネガティブ変異体であった。本研究ではその阻害機構を解明し、その作用にとって重要な残基を同定するため、欠失領域に相当する領域に指定部位突然変異誘発法を用いて変異を導入して、その効果を検討したものである。

その結果、R3C722A にドミナントネガティブ作用が認められた。R3C722A ではイオンチャネル活性が低下し、カイニン酸及びグルタミン酸に対してより高い見かけの親和性を示した。R3C722A では、AMPA 受容体のアロステリックポテンシエーターであるアニラセタムに対する感受性が増大していた。

本研究は、AMPA 型グルタミン酸受容体 GluR3 の細胞外ループ部分のシステイン残基が受容体の薬理的性質の決定に重要な役割を果たすことを明らかにした。また、この変異により、興奮性シナプス伝達を抑制する機構の一つと考えられるドミナントネガティブ効果が発現する事を明らかにしたものである。本研究はグルタミン酸受容体の構造機能連関に関して新たな知見を与え、神経科学研究に多大な貢献をなすものとする。よって学位に値する。